

- ARUNA, K. Y RAO, P., 1984. Changes in the lipid content and lipase activity in the hepatopan-creas of two fresh-water snails, *Indoplanorbis exustus* and *Melanoides tuberculatus* during parasitism. *Proceedings of the Indian Academy of Parasitology*, 5 (182): 55-58.
- BADIE, A., HOURDIN, P. Y RONDELAUD, D., 1992. L'infestation de *Cochlicopa lubrica* Müller par *Dicrocoelium lanceolatum* Rudolphi. A propos de quelques observations histopathologiques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 10 (1): 51-57.
- BOUX-BOUSSION, D., RONDELAUD, D. Y BARTHE, D., 1985a. L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. I- Etude des lésions de la glande digestive et du rein chez les jeunes mollusques. *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, 60 (5): 571-585.
- BOUX-BOUSSION, D., RONDELAUD, D. Y BARTHE, D., 1985b. L'infestation de *Lymnaea glabra* Müller par *Fasciola hepatica* L. II- Etude comparative des lésions présentées par la gonade et la glande de l'albumine chez les jeunes mollusques. *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, 60 (5): 587-599.
- CHENG, T. C., SULLIVAN, J. T. Y HARRIS, K. R., 1973. Parasitic castration of the marine prosobranch gastropod *Nassarius obsoletus* by sporocysts of *Zoogonon rubellus* (Trematoda): Histopathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21: 183-190.
- CHOUBISA, S. L., 1988. Histological and histochemical observations on the digestive gland of *Melanoides tuberculatus* (Gastropoda) infected with certain larval trematodes and focus on their mode of nutrition. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Animal Science)*, 97 (3): 251-262.
- CHOUBISA, S. L., 1990. Histopathological observations on the digestive gland of *Lymnaea auricularia* infected with larval trematodes. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Animal Science)*, 99 (5): 363-368.
- CORDERO, M. ET AL., (Editores), 1980. *Indice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Madrid, 579 pp.
- FRETTER, V. Y GRAHAM, A., 1962. *British prosobranch molluscs*. Ray Society., Londres, 755 pp.
- HUFFMAN, J. E. Y FRIED, B., 1985. Histopathological and histochemical effects of larval trematodes in *Goniobasis virginica* (Gastropoda: Pleuroceridae). *The Veliger*, 27 (3): 273-281.
- JAMES, B. L., 1965. The effects of parasitism by larval Digenea on the digestive gland of the intertidal prosobranch, *Littorina saxatilis* (Oliv) subsp. *tenebrosa* (Montagu). *Parasitology*, 55: 93-115.
- MANGA, M. Y., 1983. *Los Helicidae (Gastropoda, Pulmonata) de la Provincia de León*. Institución «Fray Bernardino de Sahagún». Excm. Diputación Provincial de León, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CECEL), León, 394 pp.
- MANGA, M. Y., 1992. Some land molluscs species involved in the life cycle of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) in the wild in the province of León (NW Spain). En Giusti y Manganelli (Eds.): *Abstracts of the Eleventh International Malacological Congress*, Siena, Italy: 248-249.
- MANGA, M. Y., GONZÁLEZ-LANZA, C. Y DEL POZO, M. P., 1991. Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in the Porma bassin (León, NW Spain). *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, 66: 57-61.
- MATTES, O., 1936. Der Entwicklungsgang des lanzettgels *Dicrocoelium lanceatum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 8: 371-430.
- READER, T. A. J., 1973. Histological and ultrastructural studies on the testis of *Bithynia tentaculata* (Mollusca: Gastropoda), and on the effects of *Cercaria helvetica* (Trematoda: Digenea) on this host organ. *Journal of Zoology (London)*, 171: 541-561.
- RECIO, A., MARIGÓMEZ, J. A., ANGULO, E. Y MOYA, J., 1988. Zinc treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater* (L.) sublethal effects at the histological level. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 865-871.
- RIO-LOZANO, J. D., 1967. Epizootología de la dicroceliosis en la provincia de León. *Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León*, 4: 163-237.
- SINDOU, P., RONDELAUD, D. Y BARTHE, D., 1990. Visceral pathology and size of the host snail: comparative studies in *Lymnaea glabra* infected by *Fasciola hepatica*. *Parasitological Research*, 76: 280-281.
- SOTO, M., AGIRREGOIKOA, M. G., PÉREZ, M. A. Y MARIGÓMEZ, J. A., 1990. A planimetric study of morphological variability in the digestive diverticula of *Littorina littorea* (L.) and *Mytilus edulis* (L.) *Journal of Molluscan Studies*, 53: 339-344.
- SOULSBY, E. J. L., 1968. *Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals*. Baillière. London. 6th ed.
- YOSHINO, T. P., 1976. Histopathological effects of larval Digenea of the digestive epithelia of the marine prosobranch *Cerithidea californica* and fine structural changes in the digestive gland. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28: 209-216.

Recibido el 1-III-1993

Aceptado el 18-VI-1993

Acumulación de mercurio (Hg) y alteraciones celulares en la glándula digestiva de ostras (*Ostrea edulis*) contaminadas experimentalmente

Mercury (Hg) accumulation and cellular alterations in the digestive gland of experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*)

Montserrat POQUET, Montserrat BIGAS y Mercè DURFORT*

RESUMEN

En el presente estudio se han determinado los distintos niveles de concentración de mercurio en las branquias y la masa visceral de la ostra plana y los cambios inducidos por el Hg en el epitelio de la glándula digestiva.

Ejemplares de *Ostrea edulis* procedentes de cultivos del delta del Ebro (Tarragona) se han mantenido durante un período de 22 días expuestos a concentraciones de 2,5, 5 y 10 µg Hg/l. Los resultados de los análisis realizados mediante espectrometría de absorción atómica muestran una incorporación del contaminante en los tejidos de la ostra que se incrementa en función del tiempo. El estudio estructural y ultraestructural de la glándula digestiva indica un incremento del contenido lisosómico de las células epiteliales y una disminución de las reservas de glucógeno y lípidos en el tejido intersticial de la glándula. La capacidad de retención del contaminante en los tejidos de la ostra y las alteraciones intracelulares detectadas indican que las dosis de contaminante utilizadas no deberían afectar a la viabilidad de las ostras estudiadas.

ABSTRACT

The present study attempt is to determine the levels of concentration of mercury in different organs of the flat oyster and to describe possible changes induced in the epithelium of the digestive gland.

Specimens of *Ostrea edulis* were collected from cultivations in the Ebro Delta (Tarragona) and exposed to concentrations of 2.5, 5 and 10 µg Hg/l for 22 days. Results of atomic absorption spectrometry indicate that contaminants steadily incorporate in the oyster tissues. The structural and ultrastructural study of the digestive gland shows an increase in lysosomal contents in epithelial cells and a decrease in glycogen and lipids in the interstitial connective tissue of the gland. The ability to sequestrate contaminants in oyster tissues and the subcellular alterations detected indicate that the doses of contaminant used might not affect the viability of the studied flat oysters.

PALABRAS CLAVE: *Ostrea edulis*, Hg, glándula digestiva, glucógeno.

KEY WORDS: *Ostrea edulis*, Hg, digestive gland, glycogen.

* Unitat de Biologia Cel·lular. Departament de Bioquímica i Fisiologia. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08071, Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de los moluscos bivalvos para incorporar y concentrar en sus tejidos cantidades importantes de metales traza potencialmente tóxicos han motivado numerosos trabajos de investigación, que han intentado dilucidar los mecanismos implicados en dichos procesos de bioacumulación. En este sentido, especies como *Mytilus edulis* constituyen excelentes indicadores de la contaminación del medio acuático (BROOKS Y RUMSBY 1965; AMIARD, METAYER, BAUD Y RIBEYRE, 1991).

La importancia económica de los moluscos, su situación dentro de la cadena trófica y las ventajas que supone disponer de buenos indicadores frente a los costosos y a veces difíciles análisis de aguas y sedimentos (PHILLIPS Y SEGAR, 1980), hacen que estos estudios sean aún en la actualidad, un tema vigente y de gran importancia. Por otro lado, la contaminación del medio acuático es un proceso continuo debido tanto a aportaciones habituales (vertidos industriales y residuos de las grandes ciudades), como a situaciones que no por ser puntuales revisten menos gravedad, como los accidentes de buques petroleros, que originan las mareas negras.

Existe una gran diversidad de comportamiento entre las diferentes especies frente a la captación de contaminantes e incluso se hallan variaciones en una misma especie respecto a distintos metales. Esta variabilidad puede ser utilizada para diseñar programas de control del medio ambiente empleando los organismos más adecuados como indicadores biológicos. Dentro de los moluscos bivalvos, las ostras y los mejillones han sido ampliamente utilizados como organismos bioindicadores, debido a su amplia distribución geográfica y a su capacidad de bioacumulación de distintos tipos de contaminantes (GOLDBERG, BOWEN, FARRINGTON, HARVEY, MARTIN, PARKER, RISEBROUGH, ROBERTSON, SCHNEIDER Y GAMBLE, 1978; TAVARES, ROCHA, PORTE, BARCELO Y ALBAIGES, 1988). El interés del Hg como contaminante reside en su utili-

zación en distintas industrias, ya sea en la utilización de combustibles fósiles que liberan mercurio directamente a la atmósfera, o vertidos directamente al medio acuático en las plantas papeleras o en las manufacturas químicas. El Hg también ha sido utilizado como fungicida en tratamientos de semillas, aunque este proceso ha ido disminuyendo en los últimos años (VON BURG Y GREENWOOD, 1991).

Su importancia como agente tóxico, conocida ya desde la antigüedad, se puso de relieve a raíz de distintos accidentes con graves consecuencias para la población. El más conocido es, sin duda, el ocurrido en Minimata (FUJIKI Y TAJIMA, 1992) aunque, posteriormente, se dieron otros casos: Iraq (GREENWOOD, 1985). En todos ellos, el denominador común fue el consumo de alimentos previamente contaminados, principalmente peces y moluscos, aparentemente, en buen estado.

La importancia de los efectos tóxicos del mercurio aumenta debido a la existencia de distintas formas químicas, cada una de ellas con distintos efectos, siendo los más conocidos los transtornos neuro y embriotóxicos causados por las formas orgánicas (metilmercuriales).

El objetivo de este estudio reside en la determinación de las concentraciones de $HgCl_2$, que permitan detectar una acumulación significativa de mercurio en distintos intervalos de contaminación y posibles alteraciones celulares en la glándula digestiva de la ostra plana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Ostrea edulis* estudiados, proceden del Maresme (Barcelona) aunque su posterior desarrollo y engorde ha tenido lugar a unos 120 km, en el delta del Ebro (Tarragona). Los individuos, de ambos sexos, dos años de edad y un peso seco medio de $0,8 \pm 0,1g$, se han sometido a un período de aclimatación de 8 días para contrarrestar los efectos del cambio brusco que supone pasar de un ambiente natural con una nutrición multispecífica a una situación

Tabla I. Condiciones experimentales de los dos bioensayos.

Table I. Experimental conditions of the two bioassays.

BIOENSAYO I	BIOENSAYO II
acuario A: control	acuario A1: control
acuario B: 2,5 µg HgCl ₂ /l	acuario A2: control
acuario C: 5 µg HgCl ₂ /l	acuario B1: 5 µg HgCl ₂ /l
acuario D: 10 µg HgCl ₂ /l	acuario B2: 5 µg HgCl ₂ /l

controlada. Los cinco primeros días se sometieron a ayuno con el fin de estabilizar sus condiciones fisiológicas.

Se han llevado a cabo dos bioensayos, utilizando en cada uno de ellos 44 individuos distribuidos en cuatro grupos. Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla I.

Las ostras seleccionadas se colocaron en acuarios de vidrio en el interior de una cesta de material plástico, con un volumen de agua proporcional al número de individuos, a razón de 1 individuo/l.

Se ha utilizado agua de mar natural proporcionada por el Parque Zoológico de Barcelona con una salinidad del orden de 38‰ y una temperatura media de 20 °C.

Las ostras han sido alimentadas mediante un preparado comercial del alga cianofícea *Spirulina* (*Espirulina*, B12. SANTIVERI). La dosis suministrada fue de 0,25 g/individuo/día, aunque posteriormente se redujo debido a que el agua utilizada era rica en diatomeas, al no haber sido previamente filtrada.

Contaminación experimental: Ambos estudios se han realizado durante los meses de mayo y junio (1992). La fase de contaminación se inició tras finalizar el período de aclimatación (8 días).

El mercurio ha sido introducido como sal, HgCl₂, disuelta en agua destilada ligeramente acidificada, sin que su adición variara de forma significativa el pH y salinidad del agua de los acuarios. Las concentraciones utilizadas se indican en la Tabla I.

Con el fin de no interferir con la concentración experimental del contaminante, no se utilizaron filtros y por tanto el agua tuvo que ser renovada diariamente.

En ambas experiencias, se establecieron cuatro tiempos para la toma de muestras: t_0 al final del período de aclimatación, y t_1 , t_2 , t_3 , a los 7, 13, y 18 días de exposición al Hg para el primer bioensayo y 8, 15, y 22 días para el segundo (Tablas II y III). En cada caso se tomaron de dos a cuatro individuos por condición experimental y por tiempo.

Espectrometría: Se ha estudiado la acumulación de Hg en branquias y en el resto del cuerpo (masa visceral) de forma independiente. Los órganos fueron aislados en el momento de la toma de muestras y congelados hasta su procesamiento.

Las muestras de tejido fresco (aprox. 0,6 g) fueron sometidas a una digestión con 2,5 ml de ácido nítrico (Suprapur) en bombas de teflón, a 125 °C durante dos horas.

La cuantificación se ha llevado a cabo mediante espectrometría de absorción atómica (Espectrómetro PHILIPS PV9200), en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona, adoptando la técnica del vapor frío, específica de elementos altamente volátiles, como el mercurio.

Microscopía óptica: Individuos control y contaminados (t_0 , t_4), fueron fijados *in toto* con formaldehído al 10% e incluidos en parafina. Los cortes de 7 µm fueron teñidos rutinariamente con he-

Tabla II. Primer bioensayo. Mercurio acumulado en $\mu\text{g/g}$ peso seco (ppm) en branquias (arriba) y masa visceral (abajo).

Table II. First bioassay. Accumulated mercury in $\mu\text{g/g}$ dry weight (ppm) in gills (up) and visceral mass (down).

Tiempo (días)	control	2,5 μg HgCl_2/l	5 μg HgCl_2/l	10 μg HgCl_2/l
Branquias				
0	1,196	1,196	1,196	1,196
7	0,788	4,872	10,122	23,147
13	2,694	17,963	23,370	22,581
18	3,039	26,778	52,692	61,452
Masa Visceral				
0	0,897	0,897	0,897	0,897
7	0,888	2,776	10,380	10,846
13	1,474	11,570	29,321	24,735
18	1,844	13,169	17,660	26,994

Tabla III. Segundo bioensayo. Mercurio acumulado en $\mu\text{g/g}$ peso seco (ppm) en branquias (izquierda) y masa visceral (derecha).

Table III. Second bioassay. Accumulated mercury in $\mu\text{g/g}$ dry weight (ppm) in gills (left) and visceral mass (right).

Tiempo (días)	control	5 $\mu\text{gHgCl}_2/\text{l}$	control	5 $\mu\text{gHgCl}_2/\text{l}$
	Branquias		Masa Visceral	
1	1,262	1,262	0,923	0,923
8	1,189	9,160	0,740	4,807
15	1,040	16,415	0,753	9,208
22	1,228	24,208	0,927	8,186

matxilina-eosina o bien mediante el método de Mallory. Las observaciones se han llevado a cabo con un microscopio OLYMPUS CH2.

Microscopía electrónica: Fragmentos de branquias y glándula digestiva, de los mismos individuos procesados para espectroscopía, fueron prefijados durante dos horas a 4 °C con una mezcla de glutaraldehído 2,5% - paraformaldehído 2%, tamponada con cacodilato sódico. Después de un cuidadoso lavado con la misma solución tampón, fueron sometidos a una postfijación con tetraóxido de osmio al 1%. La inclusión, previa deshi-

dratación con acetona, se efectuó en resina Spurr (SPURR, 1969).

Los cortes semifinos han sido habitualmente teñidos con azul de metileno-bórax 1%. Las secciones ultrafinas, recogidas en rejillas de Cu fueron sometidas a un contrastado rutinario con acetato de uranilo y citrato de plomo, según la técnica de REYNOLDS (1963). Para evidenciar el glucógeno, algunos cortes ultrafinos se contrastaron con la técnica de THIÉRY (1967). Las observaciones se han realizado con un microscopio electrónico de transmisión, PHILIPS-301 de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

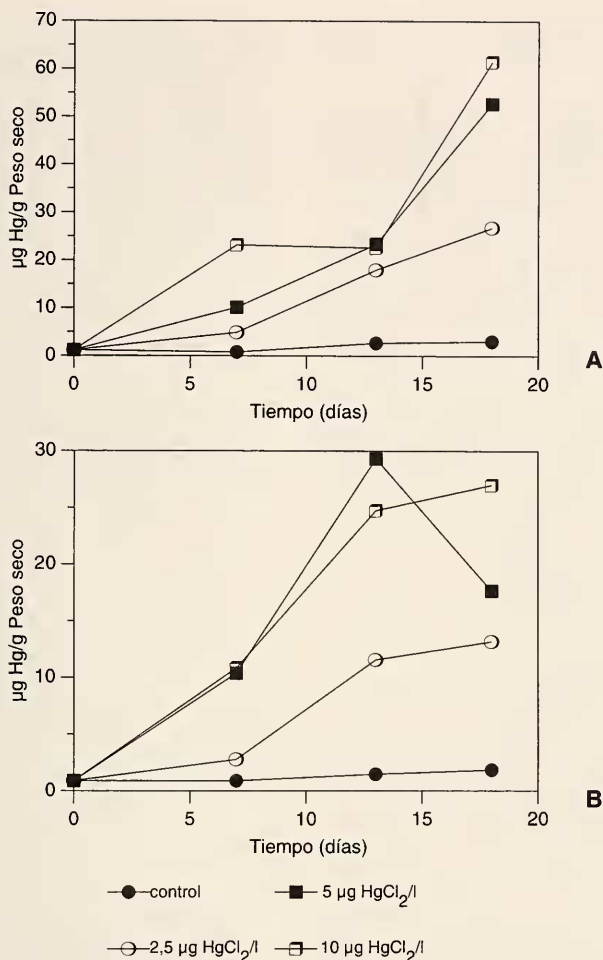


Figura 1. Representación gráfica de los datos obtenidos en el primer bioensayo. En ordenadas figura la cantidad de mercurio acumulada en $\mu\text{g/g}$ peso seco (ppm) y en abscisas, el tiempo en días. A: resultados pertenecientes a las branquias; B: resultados pertenecientes a la masa visceral.

Figure 1. Graphic results of data from the first bioassay. Ordenates show the Hg accumulated quantity in $\mu\text{g/g}$ dry weight (ppm), abscises time in days. A: gills data; B: visceral mass data.

RESULTADOS

No se ha observado mortalidad significativa a lo largo del período experimental, para ninguna de las concentraciones utilizadas.

Niveles de Hg: Los resultados del primer bioensayo (Tabla II), confirman el proceso de acumulación del mercurio.

Vemos que la cantidad de Hg acumulada en las branquias es siempre superior a la encontrada en la masa visceral.

En la Figura 1A, se observa como el proceso de acumulación del mercurio en las branquias sigue una tendencia exponencial, en todas las condiciones experimentales utilizadas, excepto en t_2 , 10 $\mu\text{g/l}$, debido seguramente, al mal estado de alguno de los individuos analizados.

Se observa, además, que en ninguno de los casos parece llegarse a un punto de saturación.

Sin embargo, el comportamiento en la masa visceral (Fig. 1B) es distinto. La cinética inicial sigue siendo exponencial, pero a partir del decimotercer día se inicia un descenso en el ritmo de incorporación del Hg en estos tejidos, lo que nos llevó a pensar que serían los órganos internos los que de algún modo marcarían la pauta de la cantidad máxima acumulable por individuo.

Esta idea, junto con el hecho de que la mayor disminución se produjo con la concentración de contaminante intermedia, 5 mg/l, hizo que nos decidiéramos por esta condición experimental para el segundo bioensayo.

Los datos referentes a este segundo bioensayo se muestran en la Tabla III. En este caso los acuarios 1 y 2 de cada condición experimental fueron utilizados como réplicas.

En las Figuras 2A y 2B, vemos que se confirman tanto la incorporación, creciente a lo largo del tiempo, como la mayor acumulación de Hg. En las branquias, sin embargo, hay importantes diferencias, en relación al primer bioensayo. En primer lugar, las cantidades acumuladas son muy inferiores y, en segundo término, la acumulación sigue una cinética lineal ($r=0,9998$). Por otra parte, sigue manteniéndose la diferencia entre branquias y masa visceral de forma que, en esta última, a partir del decimotercer día se inicia un descenso en el ritmo de incorporación.

El comportamiento diferente de los dos bioensayos podría explicarse mediante la variación de la temperatura que tuvo lugar durante el segundo experimento (Figs. 2A, B). De hecho, los datos t_0 y t_1 de los dos bioensayos no varían. Las diferencias se hacen marcadamente importantes a partir de que la temperatura desciende hasta los 11 °C, lo que supone una variación de 10 °C en sólo un día (teniendo en cuenta que la temperatura se medía en el momento de cambiar el agua la variación real podría haber sido mayor).

Alteraciones celulares: La observación de los cortes en parafina, de indivi-

duos control y de individuos sometidos a contaminación (t_4) no permiten detectar alteraciones notables en los distintos órganos. Sin embargo, sí hay pequeñas diferencias, especialmente a nivel de la glándula digestiva, que podrían caracterizar un grado incipiente de contaminación, teniendo en cuenta que los análisis cuantitativos realizados mediante espectroscopía confirman la acumulación de cantidades importantes de contaminante.

En los individuos control se aprecia la configuración típica de la glándula digestiva de estos bivalvos. Los túbulos que constituyen la mayor parte del tejido glandular se hallan rodeados por un tejido conjuntivo intersticial laxo y bien estructurado. El revestimiento de cada uno de los túbulos está formado por un epitelio pseudoestratificado de células prismáticas y polarizadas con el núcleo en la zona basal (Figs. 3A, B).

En los individuos contaminados, se detecta una importante desorganización del tejido conjuntivo intersticial, y se observa la presencia en el mismo de células con un alto contenido residual, que corresponden a «células pardas», que no hemos hallado en los individuos control.

A nivel de los túbulos de la glándula se aprecia una marcada reducción de la altura del epitelio y del diámetro de los mismos. En la zona apical de las células digestivas se observan dilataciones con voluminosas vacuolas, posiblemente de carácter lisosómico (Fig. 3C).

La observación de los cortes semifinos teñidos con azul de metileno permite identificar los dos tipos celulares que constituyen el epitelio de los túbulos de la glándula digestiva: células basófilas y células digestivas (Fig. 3D). En dichos cortes se ponen de manifiesto algunas diferencias entre los distintos individuos estudiados: en los individuos control, el tejido intersticial que rodea a los túbulos es rico en material de reserva finamente granular, así como en gotas lipídicas, que se ponen de manifiesto por su metacromasia con el azul de metileno (Fig. 3E). En los individuos contaminados se observa una disminución drástica de dichas reservas (Fig. 3F).

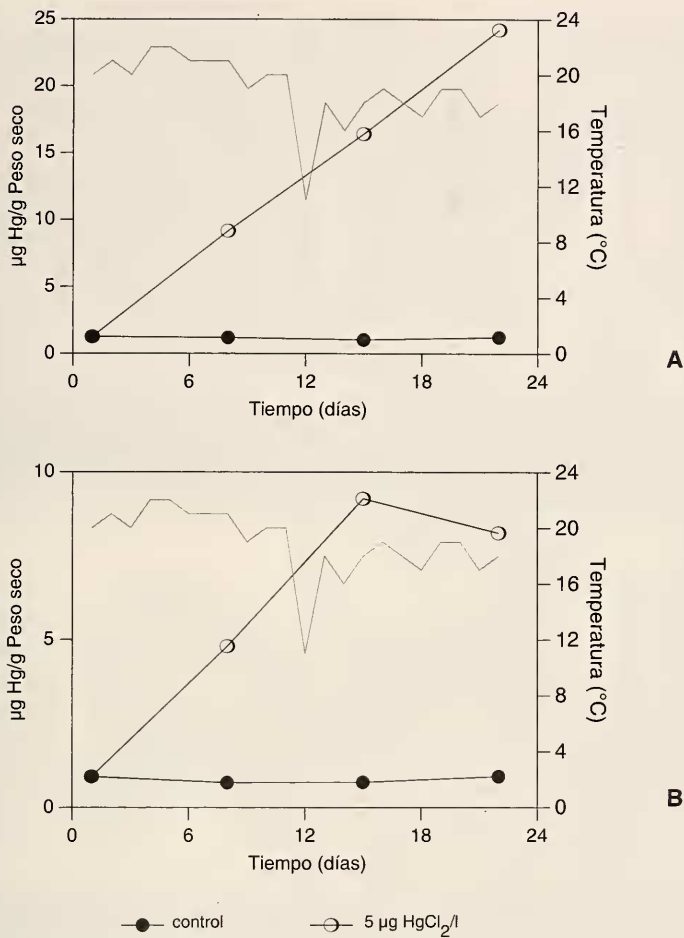


Figura 2. Representación gráfica de los datos correspondientes al segundo bioensayo. En el eje de ordenadas izquierdo se representa la cantidad de mercurio acumulado en ppm y en el derecho la temperatura en °C; en abscisas se representa el tiempo en días. A: resultados en branquias; B: resultados de la masa visceral.

Figure 2. Graphic results of data from the second bioassay. Left ordenates show the Hg accumulated quantity in ppm, right ordenates show temperature in °C; abscises time in days. A: gills data; B: visceral mass data.

En los individuos control, las células basófilas presentan una distribución homogénea del retículo endoplasmático (Fig. 4D) en la periferia del núcleo y muy escasos lisosomas y gránulos de secreción en la zona apical. Ambos tipos celulares presentan cilios y escasos microvilli, si bien las células digestivas se diferencian por la dilatación de la

región apical debido al incremento del número de lisosomas. En ambos tipos celulares los núcleos presentan una heterocromatina regularmente distribuida y un prominente nucléolo. En la región basal de ambos tipos celulares se aprecian invaginaciones de la membrana (Figs. 4B, D), que ocasionalmente pueden englobar algunas mitocondrias.

El tejido conjuntivo intersticial se halla en estrecho contacto con la lámina basal del epitelio que reviste los túbulos (Fig. 4A). En los individuos control se aprecian numerosas inclusiones lipídicas distribuidas en la zona más periférica de la célula. Asimismo, se detecta un elevado contenido en glucógeno que se pone de manifiesto con la técnica de Thiéry (THIÉRY, 1967) (Figs. 4B, C). Las células digestivas de los túbulos presentan un contenido en glucógeno más bien escaso.

En los ejemplares sometidos a 21 días de contaminación se observa un incremento en el número y tamaño de los lisosomas de las células digestivas (Fig. 4E) respecto a los individuos control (Fig. 4D). A nivel del núcleo se observa una distribución más laxa de la heterocromatina,

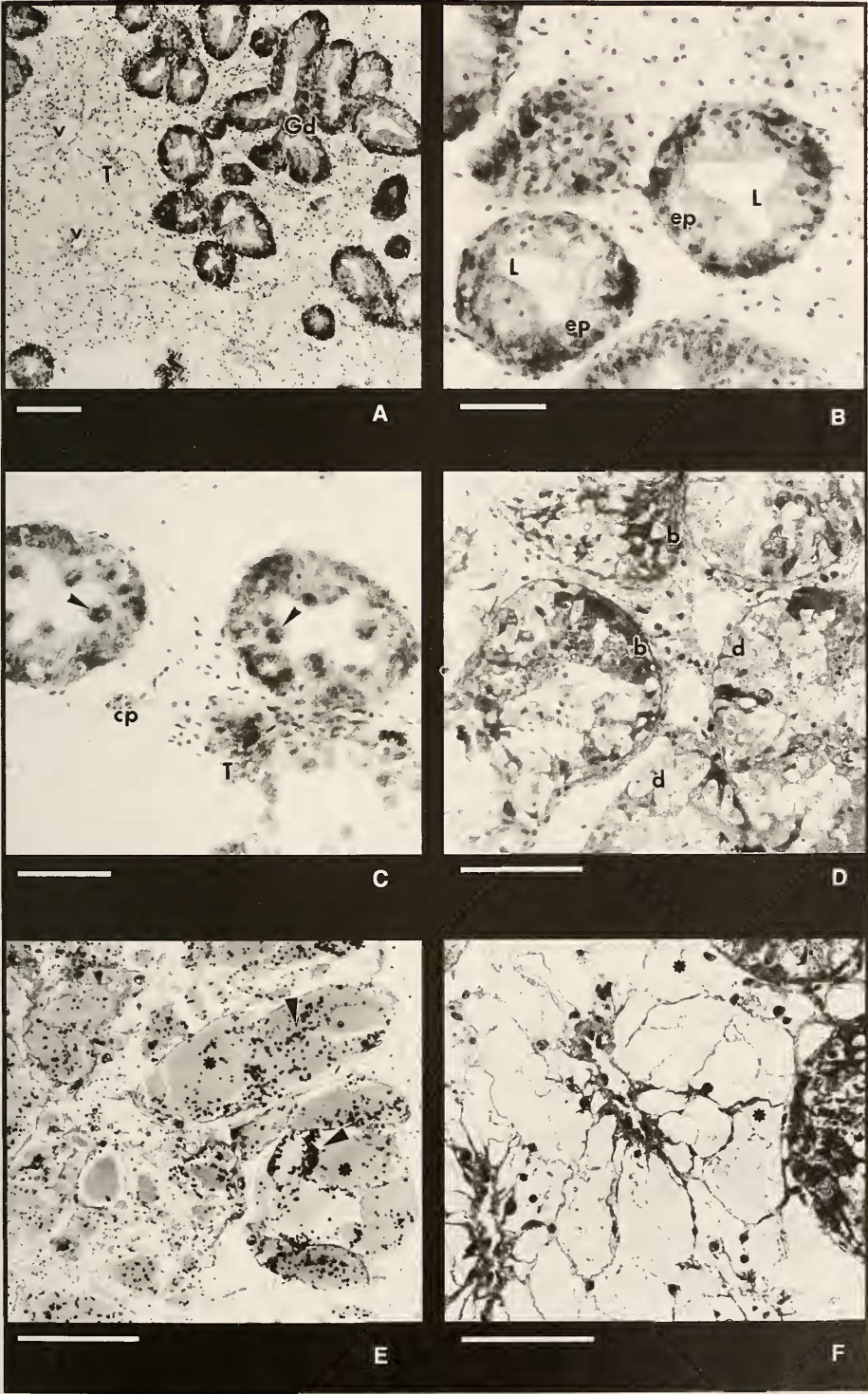
algunas dilataciones en la envoltura nuclear y, en algunos casos, fragmentación del material nucleolar. Únicamente escasas células presentan estadios avanzados de necrosis. En los cortes ultrafinos el tejido conjuntivo intersticial revela una disminución notable del contenido de glucógeno y lípidos, lo que le confiere un aspecto laxo característico.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad *O. edulis* para alcanzar niveles de 50 a 60 ppm de Hg (peso seco), después de un intervalo de contaminación de 18 días, a concentraciones de 5 y 10 μg de HgCl_2/l , sin que

(Página derecha). Figura 3. A: corte de parafina de la glándula digestiva de un individuo control, en el que se aprecia la textura del tejido conjuntivo intersticial (T) y la distribución en el mismo de los túbulos de la glándula (Gd) y vasos hemolinfáticos (v). (H/E). B: detalle de los túbulos de la glándula digestiva, del mismo ejemplar. Se observa el epitelio pseudoestratificado (ep) y las distintas configuraciones que adoptan la luz de los túbulos (L). (H/E). C: corte de parafina de glándula digestiva de un individuo sometido a 5mg de HgCl_2 durante 21 días. Se aprecia una clara desestructuración del tejido conjuntivo intersticial (T) y la presencia en el mismo de células con un alto contenido residual (célula parda: cp). Nótese la aparición en la zona apical de las células de los túbulos, de grandes lisosomas (flecha). (H/E). D: corte semifino de la glándula digestiva de un individuo control, donde se ponen de manifiesto los dos tipos celulares que componen el epitelio, células de carácter basófilo (b) y células digestivas (d). (Azul de metileno). E: corte semifino de glándula digestiva de un individuo control, en el que se observa el tejido intersticial que rodea a los túbulos, formado por células llenas de material granular de reserva (*) e inclusiones lipídicas (flechas). (Azul de metileno). F: imagen correspondiente a la anterior, pero de un individuo sometido a contaminación durante 21 días. Se observa como las células que rodean los túbulos aparecen vacías (*). (Azul de metileno). Escalas, A: 100 μm ; B-F: 50 μm .

(Right page). Figure 3. A: paraffin section of the digestive gland of a control specimen, showing the texture of the interstitial connective tissue (T) and the distribution of the gland tubules (Gd) and hemolymphatic ducts (v). (H/E). B: detail of the digestive gland tubules of the same specimen. The pseudostratified epithelium (ep) and the different arrangements the tubules span (L) can have are visible (H/E). C: paraffin section of the digestive gland of an specimen exposed to 5 mg HgCl_2 for 21 days. It is noticeable the clear desestructuration of the interstitial connective tissue (T) and the presence in the latter of cells with a high residual content (brown cell: cp). Notice the appearance in the tubules cells apical area of great lysosomes (arrow). (H/E). D: semithin section of the digestive gland of a control specimen, where the two cellular types which make up the epithelium, basophile (b) and digestive (d) cells, are noticeable. (Methylene blue). E: semithin section of the digestive gland of a control specimen, showing the interstitial tissue surrounding the tubules, made up of cells full of granular reserve material (*) and lipidic inclusion (arrows). (Methylene blue). F: the same as E, but belonging to an specimen exposed to contamination for 21 days. Note that cells surrounding the tubules are empty (*). (Methylene blue). Scale bars, A: 100 μm ; B-F: 50 μm .



su viabilidad se vea seriamente afectada. Esta resistencia de la ostra, junto con su capacidad bioacumuladora la convierte en un importante vector contaminante dentro de la escala trófica, con el riesgo que esto supone en caso de contaminación grave.

El hecho de que la cantidad de Hg detectada en las branquias sea siempre superior a la de la masa visceral, parece lógico si tenemos en cuenta que las branquias están en contacto directo con el agua y directamente implicadas en la incorporación del contaminante.

En los dos bioensayos, la incorporación de Hg en las branquias sigue un ritmo creciente, mientras que en la masa visceral (Figs. 1B y 2B), a partir del decimotercer día de exposición se inicia una estabilización en la incorporación del contaminante en todas las concentraciones utilizadas. Este comportamiento podría asimilarse al descrito por METAYER, AMIARD-TRIQUET Y BAUD (1990) en *Crassostrea gigas* bajo condiciones de contaminación experimental con Ag. El nivel máximo de incorporación de Ag en los tejidos blandos de *C. gigas* se alcanza en

el decimocuarto día de contaminación experimental y los porcentajes de Ag retenidos a partir de este día no se consideran significativos.

Los datos obtenidos en nuestro estudio indican que la captación de mercurio en función del tiempo por *O. edulis* sigue una tendencia exponencial, ya descrita por otros autores (GEORGE Y VIARENGO, 1985). Este comportamiento podría ser explicado por la existencia de dos procesos distintos de captación: uno de ellos consistiría en la entrada de mercurio por difusión pasiva, mientras que en el otro habría una captación del metal mediante procesos de pinocitosis, siendo este último parcialmente dependiente de energía (GEORGE, PIRIE Y COMBES, 1977; WRENCH, 1978). Si este punto se confirmara, sería explicable el hecho de que la disminución de la temperatura modificara el comportamiento de captación del mercurio durante el segundo bioensayo, no sólo con la disminución de las cantidades acumuladas, sino también en la forma de hacerlo. Distintos autores han confirmado la existencia de una correlación positiva entre la acumu-

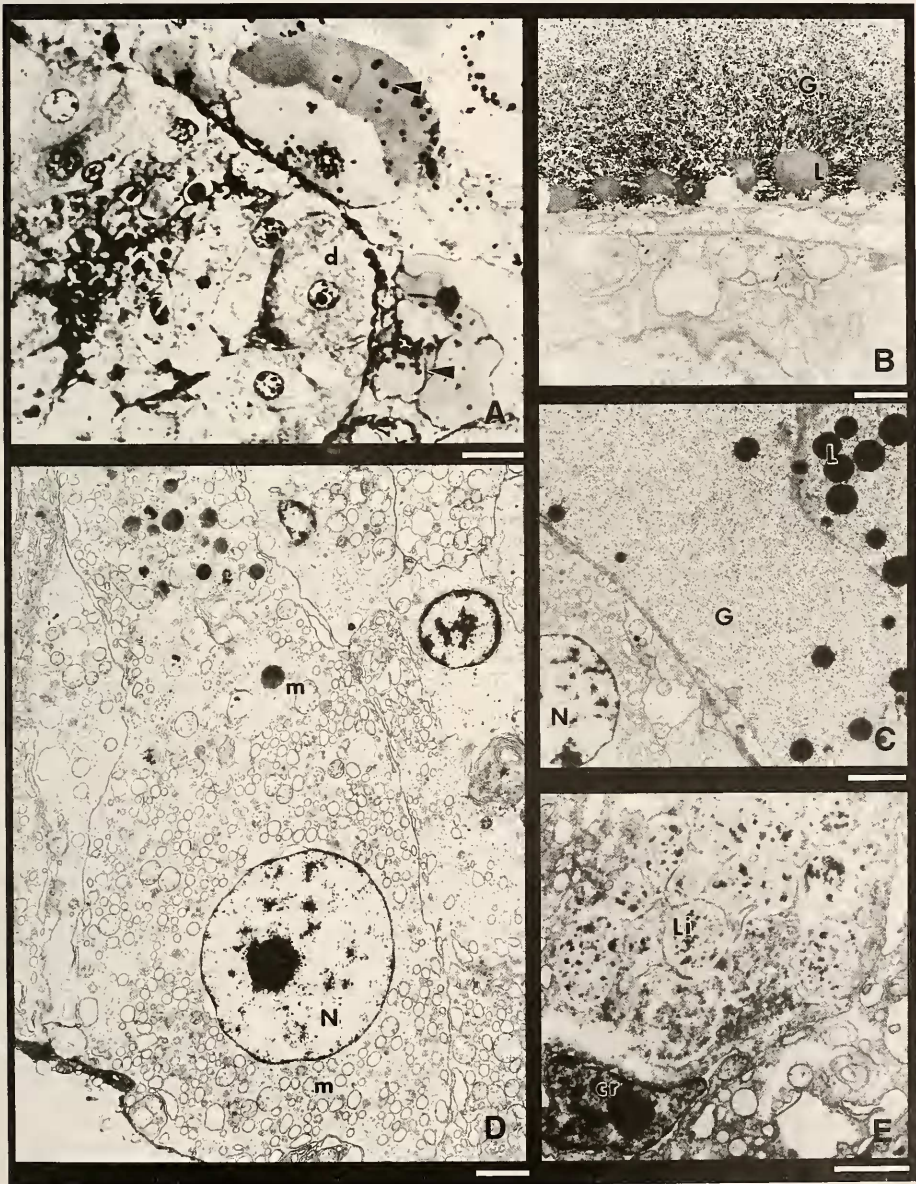
(Página derecha). Figura 4. A: corte semifino de glándula digestiva de un individuo control, en el que se observan células digestivas (d). El tejido intersticial que envuelve el túbulo presenta numerosas inclusiones lipídicas. (Azul de metileno). B: la región celular que contiene el glucógeno manifiesta reacción positiva frente a la técnica de Thiéry. Se aprecian también algunos gránulos de glucógeno en la región basal del epitelio del túbulo adyacente (flecha). C: detalle de una célula del tejido vesicular, en la que se aprecia la distribución periférica de los lípidos (l) y el elevado contenido de glucógeno (g). D: célula basófila del epitelio de un túbulo de la glándula digestiva de un individuo control. El retículo endoplasmático rugoso se halla distribuido en pequeñas vesículas en la periferia del núcleo (N). m: mitocondrias. E: detalle de una célula digestiva de un ejemplar del periodo t₃ de contaminación. Se observa la abundancia y dilatación de los lisosomas (li) y la modificación del material cromatínico (cr). Escalas, A: 10 µm; B-E: 1 µm.

(Right page). Figure 4. A: Semithin section of the digestive gland of a control specimen, showing the digestive cells (d). The interstitial tissue surrounding the tubule shows numerous lipidic inclusions. (Methylene blue). B: the cellular area containing glycogen reacts positively against Thiéry's technique. Some glycogen granules in the basal area of the adjacent tubule epithelium are also noticeable (arrow). C: detail of a cell from the vesicular tissue, showing the peripheral arrangement of lipids (l) and a high glycogen content (g). D: basophile cell from the epithelium of a digestive gland tubule in a control specimen. Rough endoplasmatic reticulum is distributed in small vesicles around the nucleus (N). m: mitochondries. E: detail of a digestive cell in an specimen of contamination period t₃. The abundance and enlargement of lysosomes (li) and changes in the chromatinic material (cr) are clearly visible. Scale bars, A: 10 µm; B-E: 1 µm.

lación de metales en animales acuáticos y la temperatura (PHILLIPS, 1976; NAKAHARA, KOYA-NAGUI Y SAIKI, 1977), probablemente debido al aumento de la tasa de filtración y a otras actividades metabólicas. Así pues, el descenso brusco de la temperatura podría haber alterado uno de los procesos de capta-

ción, probablemente el dependiente de energía. Sin embargo, para confirmar este hecho, habría que diseñar un nuevo modelo experimental, en el que una de las variables estudiadas fuera, precisamente, la temperatura.

Por otro lado, los resultados obtenidos del estudio mediante microscopía



óptica y electrónica muestran los cambios estructurales y ultraestructurales a nivel de la glándula digestiva de los ejemplares de *O. edulis*. En los trabajos ecotoxicológicos e histopatológicos realizados en distintas especies de moluscos bivalvos se han estudiado las branquias, el riñón y el hepatopáncreas, como principales órganos diana en los que se detecta mayoritariamente el efecto de los contaminantes inorgánicos (GEORGE Y VIARENGO, 1985; METAYER, AMIARD-TRIQUET Y BAUD, 1990). En la especie *O. edulis* que hemos estudiado, las alteraciones histológicas afectan tanto al epitelio de los túbulos de la glándula digestiva como al tejido conjuntivo intersticial. La reducción del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva se ha descrito en distintas especies de moluscos como una alteración histológica en respuesta a distintos tipos de contaminación, ya sea con metales o bien con derivados del petróleo (MARIGOMEZ, SÁEZ, CAJARAVILLE, ANGULO Y MOYA, 1990). Los resultados de carácter cualitativo indican que los cambios a nivel histológico y celular se hallan estrechamente relacionados con las concentraciones de contaminante utilizadas. A nivel de la glándula digestiva de *Littorina littorea* se ha cuantificado el aumento de tamaño del sistema vacuolar y lisosómico de las células de la glándula digestiva en respuesta a concentraciones subletales de cadmio (MARIGÓMEZ, VEGA, CARAJAVILLE Y ANGULO, 1989).

Por otro lado, los estudios preliminares que estamos llevando a cabo en *O. edulis* reflejan cambios en los sistemas de endomembranas, así como a nivel de la envoltura nuclear y también en los microvilli y algunos cilios de las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva. Este tipo de alteraciones ultraestructurales han sido ya descritas a nivel de los epitelios vibrátiles de otras especies de moluscos bivalvos, también procedentes de los cultivos del delta del Ebro en distintos casos de infestación por parásitos (DURFORT, FERRER, SAGRISTA, POQUET, BOZZO, GARCÍA VALERO Y RIBES, 1991). Asimismo, la mayor presencia de «células pardas» en el tejido intersticial de los individuos contamina-

dos, creemos que responde a un incremento de la función macrofágica como respuesta a la contaminación.

En la glándula digestiva de *O. edulis* hemos observado como la desestructuración del tejido conjuntivo intersticial va acompañada de una dispersión del contenido granular, que implica una neta disminución del material de reserva, tanto de glucógeno como de lípidos. En principio, cabría pensar que esta variación podría estar relacionada con el cambio de dieta al que se sometieron las ostras estudiadas, pero, de ser así, los cambios también serían evidentes en los individuos control que, como hemos visto muestran una constitución normal. La disminución del contenido de reservas en la glándula digestiva ha sido observada en moluscos gasterópodos al cabo de una hora de la administración de un molusquicida (Cletocarb 0,01%), lo que pone de manifiesto como las variaciones de las sustancias de reserva se hallan estrechamente relacionadas con las concentraciones de distintos tipos de contaminante incorporadas a la alimentación (TRIEBSKORN Y KUNAST, 1990). Este tipo de alteraciones de carácter metabólico se han observado en ejemplares de *Crassostrea gigas* sometidos a contaminación experimental con Ag (MAR-TOJA, BALLAN-DUFRAÑÇAIS, JEANTET, GOUZERTH, AMIARD, AMIARD-TRIQUET, BERTHET Y BAUD, 1988; METAYER ET AL., 1990). Dichos autores relacionan las deficiencias en el contenido en glucógeno de la glándula digestiva con un efecto inhibidor de la Ag a nivel de las vías metabólicas. La verificación de esta hipótesis en lo que se refiere a los efectos del Hg sobre *O. edulis* tendría que basarse en un estudio de la especiación del mercurio analizado.

En los casos de contaminación con mercurio se ha comprobado que, en almejas, niveles de contaminación del orden de 0,6 µg/l producen un descenso en los niveles de glucógeno con la consiguiente acumulación de ácido láctico (SATYHYANATHAN, NAIR, CHACKO Y NAMBIAN, 1988). Asimismo existe la posibilidad de que *O. edulis* emplee estrategias metabólicas parecidas a las de